



**SORAIA PEREIRA
MORTÁGUA**

**PLANO DE CONTROLO INTERNO DO
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA**



**SORAIA PEREIRA
MORTÁGUA**

**PLANO DE CONTROLO INTERNO DO
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica do Doutor António Correia, Professor do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Dra. Fátima Sodré do Departamento de Controlo de Qualidade da Nestlé – Fábrica de Avanca.

Dedico este trabalho à minha mãe.

o júri

presidente

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso (Presidente)
Professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia (orientador)
Professor catedrático da Universidade de Aveiro

Doutora Cláudia Sofia Soares de Oliveria
Investigadora em pós-doutoramento do CESAM

Dr.^a Maria de Fátima Aroeira Sodré (co-orientadora)
Chefe do Controlo de Qualidade da Nestlé – Fábrica de Avanca

agradecimentos

O meu sincero agradecimento ao Engenheiro João Borges e à Dra. Fátima Sodré pela oportunidade dada.

A todos os colaboradores do Departamento de Controlo de Qualidade da Fábrica de Avanca, o meu agradecimento pela incalculável ajuda ao longo do meu estágio, que de alguma forma contribuíram para a elaboração desta tese.

palavras-chave

Controlo de Qualidade, Plano de Controlo de Qualidade Interno, Probióticos.

resumo

Hoje em dia, as entidades envolvidas no controlo de produtos alimentares estão sob constante pressão. Com um consumidor cada vez mais exigente, foram obrigados a implementar mecanismos de produção seguros e eficazes, de forma a garantir o funcionamento adequado de todas as práticas utilizadas.

O Laboratório de Microbiologia da Nestlé – Fábrica de Avanca possui um Plano de Controlo de Qualidade Interno revisto e atualizado recentemente, em que as principais componentes sujeitas a alterações foram: os equipamentos, meios de cultura e reagentes, higiene e ambiente, analistas e verificação do cumprimento dos métodos analíticos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações e, através da rotina laboratorial, integrá-las de modo a facilitar o seu cumprimento.

Com o objetivo de aumentar o valor nutritivo, as farinhas lácteas da Nestlé incluem na sua composição probióticos. Neste trabalho, foi também realizado um estudo de forma a verificar a possibilidade de mudança de parâmetro de liberação para parâmetro de monitorização em relação à quantidade de probióticos presentes nestas farinhas

keywords

Quality Control, Internal Quality Control Plan, Probiotics

abstract

Nowadays, the entities involved in the control of food products are under constant pressure. With an increasingly demanding consumer, these entities were forced to implement mechanisms of production safe and efficient, in order to ensure the adequate operation of all used practices.

The Néstle – Avanca's factory – has an internal plan of quality control revised and updated recently, in which the main components subjected to changes were: the equipments, culture medium and reagents, hygiene and environment, analysts and the performance of analytical methods.

The goal of this essay was to evaluate these changes and, through laboratory routine, integrate them in order to facilitate their performance. With the objective of increasing the nutritive value, Néstle's baby cereals include probiotics in their composition. In this essay, it was also made a study in order to verify the possibility of changing from release parameter to monitor parameter in what the amount of probiotics present in these baby cereals are concerned.

Índice

1.	Objetivos	1
2.	Introdução.....	1
2.1	Nestlé.....	1
3.	Microbiologia Alimentar	2
4.	Microbiologia alimentar e Saúde Pública.....	3
5.	Qualidade e Segurança na Indústria Alimentar	4
5.1	Controlo de qualidade.....	4
5.2	Controlo de qualidade interno	5
6.	HACCP	6
7.	Departamento de controlo de qualidade da Nestlé – Fábrica de Avanca	9
8.	Plano de Controlo Interno do Laboratório de Microbiologia da Nestlé – Fábrica de Avanca	10
8.1	Equipamentos e instrumentos de análise	10
8.1.1	Estufas	11
8.1.2	Estufas de esterilização	11
8.1.3	Banhos de água com termóstato.....	12
8.1.4	Frigoríficos	13
8.1.5	Congeladores	14
8.1.6	Autoclaves	15
8.1.7	Medidores do pH	16
8.1.8	Balanças	17
8.1.9	Instrumentos volumétricos	17
8.2	Meios de cultura e reagentes	18
8.3	Higiene.....	19
8.4	Analistas	21
8.5	Verificação de Cumprimento dos Métodos	22
9.	Probióticos	23
9.1	Benefícios à saúde.....	24
9.2	Probióticos em alimentos.....	25
9.3	Probióticos e Saúde.....	26
10.	Metodologia.....	28
10.1	Plano de Controlo Interno	28
10.1.1	Equipamento.....	28
10.1.2	Meios e Reagentes	32
10.1.3	Higiene e ambiente	35

10.1.4	Analistas.....	42
10.1.5	Verificação de Cumprimento dos Métodos	42
10.2	Monitorização dos Probióticos.....	44
10.2.1	Variabilidade dentro do mesmo lote.....	45
10.2.2	Variabilidade entre lotes diferentes	46
10.2.3	Desempenho analítico.....	47
11.	Conclusão	49
12.	Bibliografia	50
Anexo 1.....		54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplo de uma planificação de controlo do ambiente	20
Tabela 2- Plano de Controlo Interno - Equipamento - Sala de Microbiologia Geral / Sala de Pesagem <i>Salmonella</i> / Sala <i>Salmonella</i>	29
Tabela 3 - Plano de Controlo Interno – Equipamento – Sala de Preparação de Meios.....	30
Tabela 4- Documentos do Plano de Controlo Interno criados e atualizados durante o estágio .	31
Tabela 5- Exemplo de códigos de rastreabilidade numa folha de registo.....	32
Tabela 6- Exemplo de códigos de rastreabilidade no documento de registo dos meios preparados da Sala de Preparação de Meios.....	33
Tabela 7 - Plano de Controlo Interno - Meios e reagentes.....	34
Tabela 8- Plano de Controlo Interno - Higiene - Sala de Preparação de Meios	36
Tabela 9 - Plano de Controlo Interno - Higiene - Sala de Microbiologia Geral.....	37
Tabela 10 - Plano de Controlo Interno - Higiene - Sala de Pesagem <i>Salmonella</i>	38
Tabela 11 - Plano de Controlo Interno - Higiene - Sala <i>Salmonella</i>	39
Tabela 12 - Plano de Controlo Interno - Ambiente - Sala de Microbiologia Geral	40
Tabela 13- Plano de Controlo Interno - Ambiente - Sala de Pesagem <i>Salmonella</i> / Sala <i>Salmonella</i>	41
Tabela 14- Exemplos de pontos abordados nas listas de ocorrências	43
Tabela 15 - Local para planos de ação e respetiva avaliação de eficácia existente nas listas de ocorrências	43
Tabela 16 - Valores relativos à homogeneidade dentro de um lote	45
Tabela 17 - Valores relativos à homogeneidade entre lotes diferentes.....	46
Tabela 18 - Resultados dos diferentes analistas na análise da mesma amostra	47
Tabela 19 - Tratamento estatísticos dos resultados da Tabela 18	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Concentração de <i>Bifidobacterium lactis</i> em diferentes amostras do mesmo lote.....	45
Figura 2 - Concentração de <i>Bifidobacterium lactis</i> em diferentes amostras de lotes diferentes.....	46

1. Objetivos

Para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, foi efetuado um estágio no Laboratório de Microbiologia da Fábrica da Nestlé de Avanca. Tendo o Plano de Controlo de Qualidade Interno sido revisto e atualizado recentemente, o objetivo do estágio foi avaliar as alterações e através do conhecimento da rotina laboratorial, integra-lo de forma a facilitar o seu cumprimento.

2. Introdução

2.1 Nestlé

A Nestlé é uma companhia alimentar fundada por Henri Nestlé, em Vevey, na Suíça, em 1866.

Preocupado com os elevados índices de mortalidade infantil vivenciados na época, inventou uma farinha láctea baseada no leite de vaca, que se revelou eficaz na alimentação das crianças nos primeiros meses de vida.

A expansão ocorreu em larga escala após a fusão da Sociedade Henri Nestlé com a “Anglo Swiss Condensed Milk Company”, possuindo neste momento cerca de 456 fábricas a operar nos cinco continentes.

Tal como no resto da Europa, no início do século XX também Portugal se deparou com a crise ao nível da alimentação infantil. Assim, em 1923, promovida pelo Professor Egas Moniz foi construída a primeira fábrica de leite em pó em Avanca, que se iria tornar o berço da Nestlé em Portugal.

Em 1933, com o apoio permanente do professor Egas Moniz, conhecedor da vida e obra de Henri Nestlé, a Sociedade de Produtos Lácteos Lda. de Avanca obtém o exclusivo de fabricação e venda de produtos Nestlé, começando assim o seu rápido crescimento e ascensão no nosso país, sendo hoje uma referência obrigatória na área da alimentação [1]. No anexo 1 é possível visualizar a variedade de produtos da fábrica de Avanca.

3. Microbiologia Alimentar

A vida não é estéril. Nós vivemos num mundo microbiológico. Os microrganismos vivem nos pântanos, nas fontes hidrotermais, no profundo oceano, em nós, nos alimentos. Fazem parte do nosso dia a dia e sem eles a vida no planeta não seria possível [2].

Os alimentos são ecossistemas onde os microrganismos podem habitar. No entanto existem vários fatores que condicionam o crescimento microbiano. Fatores relacionados com as características do próprio alimento (fatores intrínsecos – pH, atividade da água, potencial de oxidação redução, composição química do alimento) e fatores relacionados com as características do meio em que o alimento está inserido (fatores extrínsecos – humidade, temperatura, presença de outros microrganismos) [2], [3].

A presença dos microrganismos nos alimentos pode ter vários efeitos e desta forma podem ser classificados em dois grupos: microrganismos como produtores de alimentos e microrganismos como agentes de deterioração e/ou patogénicos [4].

Perante as características dos alimentos e respetivos microrganismos possivelmente presentes, microbiologistas alimentares podem criar condições que reduzam ou eliminem momentaneamente a presença de microrganismos, mas jamais os poderá eliminar definitivamente [2].

4. Microbiologia alimentar e Saúde Pública

Ao longo das últimas décadas, as doenças causadas por bactérias, fungos, vírus ou parasitas transmitidas pelos alimentos, mudaram a agenda política e geraram por vezes, uma atenção substancial [5].

Em 2005 foram relatadas 1,8 milhões de mortes provocadas por doenças diarreicas, grande parte resultante da ingestão de água ou alimentos contaminados. Este não é apenas um problema dos países subdesenvolvidos. Segundo Newll e colaboradores (2010), estima-se que, só nos Estados Unidos, a cada ano ocorrem cerca de 76 milhões de casos de doença de origem alimentar, com 325 000 hospitalizações e 500 óbitos [6].

Na tentativa de reduzir o número de casos de doenças provocadas pela ingestão de alimentos contaminados, têm sido implementadas medidas de monitorização dos alimentos, encorajando todos os setores ligados ao manuseamento de alimentos a melhorar a higiene e a incorporar sistemas de segurança alimentar como o HACCP. No entanto, estudos microbiológicos revelam que 50 a 60% dos microrganismos responsáveis por doenças gastrointestinais são desconhecidos [6].

Antes de 1960, os principais agentes reconhecidos como os principais causadores de gastroenterites eram *Salmonella ssp.*, *Shigella spp.*, *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus*. Durante os anos 60 foram adicionados, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* e mais tarde, nos anos 70, rotavírus e norovírus. Nos anos 80 e 90, houve um aumento excessivo de novos agentes que incluem *Campylobacter*, *Yersinia*, *Listeria monocytogenes*, *Cryptosporidia*, *Cyclospora* e novas estirpes de *Escherichia coli* como O157:H7. Espera-se que com a continuação da introdução de novos hábitos alimentares, a descoberta de outros microrganismos associados a este tipo de infeção aumentem no século 21 [6].

Assim, apesar do esforço científico, governamental e industrial, prevê-se que as doenças de origem alimentar provocadas por microrganismos continuarão a ser um importante problema para a saúde pública mundial, com grandes implicações no bem-estar social das populações como também nas economias nacionais [6].

5. Qualidade e Segurança na Indústria Alimentar

Na indústria alimentar, os sistemas da qualidade tem diversas funções que vão desde a gestão de documentos até ao controlo dos processos. O principal objetivo é englobar um conjunto de atividades, que garantam o desenvolvimento e comercialização dos alimentos, de acordo com os requisitos de qualidade e segurança impostos pela legislação, pelos clientes e pelos consumidores.

A qualidade e a segurança são termos que englobam conceitos diferentes. Qualidade é o conjunto de características que o alimento deve apresentar, enquanto que segurança alimentar está exclusivamente relacionada com os riscos que poderão ser prejudiciais à saúde do consumidor. No entanto, estes conceitos integram-se naturalmente. Um alimento seguro ou inócuo, se não tiver bom sabor e não responder às qualidades nutricionais, de embalagem, conservação, ou outras que dele espera o consumidor, dificilmente será o escolhido [7].

Os princípios e práticas exigidas ao nível de segurança alimentar estão integrados no sistema da qualidade, mais precisamente no âmbito do controlo da qualidade das empresas. É expectável que uma empresa alimentar tenha o sistema de HACCP como parte integrante do seu sistema de gestão da qualidade.

O HACCP é um sistema mundialmente conhecido, caracterizado como tendo uma abordagem antecipada e preventiva de perigos biológicos, químicos e físicos, detetando os problemas antes que ocorram ou no momento em que ocorrem [5].

Segundo Raszl e colaboradores (2001), o sistema HACCP, baseia-se numa série de etapas inter-relacionadas, inerentes ao processamento industrial de alimentos, que inclui todas as operações, desde a produção primária até ao consumo [8].

Incidentes relacionados com a Segurança Alimentar, demonstram que o controlo inadequado ao longo da cadeia de produção prejudica o consumidor mas também as organizações envolvidas [8].

Assim, todas as empresas do setor alimentar que se dediquem a qualquer fase de produção, transformação, armazenamento e/ou distribuição de géneros alimentícios

deve implementar um sistema HACCP de forma a garantir a segurança dos produtos alimentares produzidos, manipulados, servidos e/ou distribuídos [8].

5.1 Controlo de qualidade

Em todos os laboratórios deve ser estabelecido um programa de manutenção preventiva para assegurar o funcionamento apropriado de todas as práticas utilizadas. Assim, Controlo de Qualidade é a forma geralmente utilizada para descrever todas as medidas tomadas para garantir a qualidade de todas as práticas realizadas no laboratório, de forma a:

- Garantir a qualidade de todos os resultados obtidos na rotina diária;
- Tomar providências imediatas para eliminar as causas das não conformidades encontradas através de ações corretivas;
- Tomar medidas preventivas para evitar nova ocorrência das não conformidades encontradas [9].

5.2 Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é um controlo intralaboratorial. Tem por objetivo garantir a reprodutibilidade de todos os procedimentos efetuados (precisão de resultados), de forma a possibilitar informações que indiquem quando se tem de promover ações corretivas perante uma não conformidade [9].

6. HACCP

O HACCP é um sistema mundialmente conhecido, caracterizado como tendo uma abordagem antecipada e preventiva de perigos biológicos, químicos e físicos, detetando os problemas antes que ocorram ou no momento em que ocorrem [5].

Segundo Raszl et al (2001), o sistema HACCP, baseia-se numa série de etapas inter-relacionadas, inerentes ao processamento industrial de alimentos, que inclui todas as operações, desde a produção primária até ao consumo.

Incidentes relacionados com a Segurança Alimentar, demonstram que o controlo inadequado ao longo da cadeia de produção prejudica o consumidor mas também as organizações envolvidas [8].

Assim, todas as empresas do setor alimentar que se dediquem a qualquer fase de produção, transformação, armazenamento e/ou distribuição de géneros alimentícios deve implementar um sistema HACCP de forma a garantir a segurança dos produtos alimentares produzidos, manipulados, servidos e/ou distribuídos [8].

De forma a prevenir, eliminar ou apenas reduzir os perigos que podem vir a contaminar os alimentos, deve ter-se em conta alguns pré-requisitos, que uma vez contemplados permitam a aplicação efetiva do sistema HACCP [10].

Assim, as empresas deverão contemplar as seguintes exigências:

- **Instalações** localizadas em locais que não apresentem problemas a nível de contaminação;
- **Equipamentos e utensílios** seguros e eficazes;
- **Higienização** eficaz das instalações, equipamentos, utensílios e superfícies;
- **Controlo de pragas** adequado;
- **Abastecimento de água** que respeite os requisitos;
- **Sistemas de gestão de resíduos** adequados;
- **Fornecedores** que garantam a qualidade dos produtos;

- Trabalhadores responsáveis pela **Receção e Armazenamento** dos produtos;
- **Transporte** adequado que garanta a chegada dos produtos ao destino em condições ótimas de consumo;
- Regras instituídas de **Higiene e Saúde Pessoal**;
- Operadores com **Formação** em higiene alimentar [10].

Estes pré-requisitos tem como objetivo controlar os perigos do meio envolvente ao processo de produção, enquanto que o HACCP tem como objetivo controlar os perigos inerentes ao processo de produção [10].

Sendo este sistema desenhado de forma a controlar o processo de produção, são aplicadas medidas preventivas que garantam um controlo eficiente, através da identificação de pontos considerados perigosos. Estes perigos podem ser de ordem biológica (bactérias, vírus, fungos e parasitas patogénicos), química (pesticidas, contaminantes inorgânicos tóxicos, antibióticos, promotores de crescimento, tintas, toxinas do marisco, histamina, micotoxinas, etc.) e física (fragmentos de vidro, metal, plástico ou madeira, pedras, agulhas, espinhas, casca, areia, ou outros materiais considerados perigosos para o consumidor) [10].

Além dos pré-requisitos mencionados anteriormente, para a implementação do sistema HACCP, deverão ser consideradas 5 etapas preliminares:

- Montagem de uma equipa multidisciplinar com pessoas com experiência e conhecimentos específicos sobre o produto e o processo;
- Descrição geral do alimento, dos ingredientes utilizados e dos métodos de processamento;
- Descrição de qual o uso proposto do alimento e quais os prováveis consumidores;
- Elaboração de um fluxograma com a descrição do processo;
- Revisão e se necessário alteração do fluxograma [10].

Após cumpridas estas 5 etapas, e de acordo com o *Codex Alimentarius* para a implementação de um sistema HACCP, devem ser considerados 7 princípios:

1. Identificar os perigos e medidas preventivas;
2. Identificar os pontos críticos de controlo;
3. Estabelecer limites críticos para cada medida associada a cada ponto crítico de controlo;
4. Monitorizar/controlar cada ponto crítico de controlo;
5. Estabelecer medidas corretivas para cada caso de limite de desvio;
6. Estabelecer procedimentos de verificação que confirmem que o sistema HACCP está a decorrer de forma eficaz;
7. Criar um sistema de documentação sobre todos os procedimentos e registos apropriados a estes princípios e sua aplicação [8], [11].

A implementação de um sistema HACCP a qualquer indústria Alimentar, garante fiabilidade e segurança, sendo vantajoso não só para o consumidor como também para própria entidade [8].

7. Departamento de controlo de qualidade da Nestlé – Fábrica de Avanca

Todos os laboratórios de microbiologia devem possuir um plano de controlo de qualidade interno, que albergue todos os métodos utilizados no laboratório de forma a garantir a qualidade de todos os resultados. Neste plano devem estar sumariados todos os procedimentos e planos de monitorização. Deve ser revisto e atualizado regularmente, de forma a possibilitar deteção de eventuais fragilidades e a avaliar o desempenho dos equipamentos e dos colaboradores. Todos estes aspetos são essenciais para a obtenção de resultados laboratoriais fiáveis [12].

O departamento de controlo de qualidade da Nestlé de Avanca está dividido nas seguintes áreas:

- Laboratório de Microbiologia Geral – monitoriza a carga microbiológica de vários produtos (desde matérias primas, produtos em curso de fabricação e produtos terminados)
- Laboratório de *Salmonella* – pesquisa de *Salmonella*.
- Sala de Pesagem – pesagem de amostras para a pesquisa de *Salmonella*.
- Sala de Preparação de Meios – preparação de meios de cultura de microrganismos e esterilização de material de laboratório.
- Laboratório Físico-químico – monitoriza parâmetros físico-químicos dos alimentos e matérias primas (atividade da água, análise de proteínas, açúcares, vitaminas, etc.)
- Laboratório de Material de Embalagem – avalia/estrutura dimensões do material, condições de impressão, gramagem, espessura, etc.
- Sala de Degustação – avaliação sensorial do sabor, cor, odor e aparência de matérias-primas, semifabricados e produto final. Esta avaliação também é efetuada em produtos em conservação.

8. Plano de Controlo Interno do Laboratório de Microbiologia da Nestlé – Fábrica de Avanca

Segundo as normas definidas pela Nestlé, Plano de Controlo Interno é definido como “Conjunto de verificações conduzidas pelo laboratório para assegurar a fiabilidade dos resultados analíticos”. Este plano inclui:

- Plano de calibração para todos os equipamentos e instrumentos;
- Plano de verificação do desempenho de meios e reagentes;
- Plano de verificação de higiene;
- Plano de avaliação dos analistas;
- Plano de auditoria aos métodos para verificar o cumprimento de métodos analíticos;
- Participação regular em testes laboratoriais [13].

8.1 Equipamentos e instrumentos de análise

Todos os equipamentos devem estar incluídos no plano de controlo de qualidade interno, uma vez que podem ter um impacto direto nos resultados das análises efetuadas.

Plano de calibração dos aparelhos – verificação regular do equipamento de medição com padrões definidos para assegurar a fiabilidade dos processos e resultados de laboratório.

Plano de controlo interno do equipamento – descrição do equipamento e do seu uso, aspetos críticos da sua utilização, aspetos de controlo e registos, pessoa responsável pelo seu controlo, qual o método utilizado para esse controlo, frequência com que é efetuado e quais as ações corretivas em caso de desvio [13].

Assim, deve existir documentação atualizada de todos os aspetos acima mencionados.

8.1.1 Estufas

Estufa é um equipamento que permite o controlo e manutenção de uma dada temperatura em todo o seu volume. O controlo da temperatura varia consoante os microrganismos pesquisados.

Aspetos críticos: Cada tipo de microrganismos apresenta uma temperatura ótima de crescimento. Temperaturas muito baixas ou muito altas podem inativar o crescimento ou até mesmo matar os microrganismos. O tempo de incubação é limitante uma vez que à medida que a temperatura aumenta, ocorre um crescimento microbiano, no entanto, após algum tempo ocorrem reações de inativação ou até mesmo de desnaturação. Desta forma, além da temperatura escolhida ser um fator importante para o crescimento dos microrganismos pesquisados, o tempo de incubação também tem um papel importante para uma correta interpretação dos resultados.

De forma a evitar possíveis contaminações as estufas devem ser limpas e desinfetadas regularmente.

Para que a temperatura seja uniforme em todo o equipamento, nunca se deve encher completamente as estufas. Para evitar possíveis erros, além do sistema automático de regulação deve-se colocar um termómetro calibrado em glicerol no seu interior, de forma a ser possível um controlo e registo da temperatura mais fiáveis ao longo do tempo de incubação.

Ações corretivas: No caso de ocorrerem desvios na temperatura fora dos limites críticos definidos, deve proceder-se ao ajuste e verificar a temperatura pouco tempo depois. Se necessário deve-se chamar o técnico qualificado para reparar o equipamento. Nestes casos, dependendo da extensão do desvio, as análises em curso poderão ser ignoradas e posteriormente repetidas [13].

8.1.2 Estufas de esterilização

Estas estufas permitem a regulação para temperaturas muito elevadas, sendo utilizadas para esterilização de material.

Aspetos críticos: Como já foi referido anteriormente a temperatura pode interferir negativamente no crescimento microbiano, sendo que neste caso, o objetivo é matar os microrganismos por ação do calor. Para que a esterilização seja eficaz, é necessário ter em conta o tempo a que os microrganismos estão expostos a temperaturas elevadas, de modo a assegurar a morte de todas as formas de vida microbianas.

Tal como foi referido anteriormente, não se deve encher estas estufas em demasia, e neste caso não devem ser colocados materiais molhados ou frios, para que a temperatura seja uniforme em todo o equipamento. Para uma monitorização correta da temperatura destas estufas, devem ser colocados termómetros calibrados em areia.

Ações corretivas: No caso de se verificarem desvios na temperatura fora dos limites críticos definidos, devem ser tomadas as medidas apropriadas. Nestes casos, após resolução do problema, repete-se o ciclo de esterilização [13].

No Laboratório de Microbiologia da Nestlé de Avanca existem estufas no Laboratório de Microbiologia Geral e no Laboratório de *Salmonella* para o acondicionamento de meios de cultura para proporcionar o crescimento de microrganismos; na Sala de Preparação de Meios está disponível a estufa que é utilizada para a esterilização de material de vidro e metal.

8.1.3 Banhos de água com termóstato

Os banhos de água consistem num contentor cheio de água em que esta é mantida à temperatura desejada por meio de um sistema de termóstato automático. O grau de precisão pode variar consoante o objetivo a que se destina. Para uma precisão a partir de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, o banho tem de estar equipado com um sistema de circulação.

Aspetos críticos: De forma a assegurar um tratamento térmico eficaz, deve-se garantir que o material se encontra imerso corretamente. Se necessário, pode-se recorrer a um recipiente de referência com um termómetro calibrado de forma a proceder-se à monitorização da temperatura. Esta monitorização deve ser efetuada diariamente, tendo sempre em atenção o posicionamento dos termómetros de forma a não serem afetados pela resistência do aparelho.

Para evitar contaminações, deve-se limpar e substituir a água dos banhos regularmente.

Ações corretivas: No caso de ocorrer desvios na temperatura fora dos limites críticos definidos, deve-se proceder ao ajuste e verificar a temperatura pouco tempo depois. Se necessário, deve-se recorrer a um técnico qualificado. Nestes casos, consoante o desvio verificado, pode ter de se descartar os resultados e repetir as análises [13].

No Laboratório de Microbiologia da Nestlé de Avanca existem dois banhos de água na Sala de Microbiologia geral (um a 46°C e outro a 35°C), onde são colocados os meios de cultura a ser utilizados posteriormente. Na sala de preparação de meios existem dois banhos, sendo que a temperatura é regulada consoante o objetivo da análise.

8.1.4 Frigoríficos

O frigorífico é um equipamento que permite a manutenção de temperaturas baixas em todo o seu volume (0-4,5°C). Normalmente são utilizados para armazenar meios estéreis, reagentes, amostras, meios inoculados e estirpes.

Aspetos críticos: Sabendo que o principal objetivo dos frigoríficos é o armazenamento de material a temperaturas baixas, de forma a reduzir a possibilidade de crescimento microbiano, a monitorização da temperatura torna-se obrigatória.

O local onde é colocado e o enchimento excessivo e de forma incorreta são dois aspetos importantes a ter em consideração uma vez que podem ser responsáveis por variações da temperatura no interior do frigorífico. De forma a procede-se a uma correta monitorização, deve-se colocar um termómetro em glicerol de forma a ser possível um registo fiável da temperatura.

A higiene do frigorífico tal com a separação correta de material contaminado do material estéril são aspetos importantes para evitar contaminações cruzadas. Sendo possível deve-se ter um frigorífico para cada situação.

Ações corretivas: No caso de ocorrerem desvios na temperatura fora dos limites críticos definidos, deve-se proceder ao ajuste e verificar a temperatura pouco tempo depois. Se necessário, pode-se recorrer a um técnico qualificado. Nestes casos, consoante

o desvio verificado, as análises podem ter de ser repetidas, tal como descartados reagentes ou meios armazenados [13].

No Laboratório de Microbiologia da Nestlé de Avanca existe um frigorífico na Sala de Microbiologia Geral onde são devidamente armazenados meios de cultura, reagentes, e amostras. Na Sala de *Salmonella* existem três. Um para material contaminado, outro para material estéril e um último para armazenamento de reagentes. Existe ainda um frigorífico na Sala de Amostragem (local onde se colocam as amostras até terem o tempo suficiente para ser descartadas), onde são armazenados reagentes.

8.1.5 Congeladores

Os congeladores são câmaras isoladas que permitem uma manutenção de temperatura em todo o seu volume de -18 a $-80 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. São utilizadas para armazenamento de meios, reagentes estéreis, amostras e estirpes.

Aspetos críticos: Tal como nos frigoríficos, o principal aspeto crítico deste equipamento é a correta manutenção da temperatura. Portanto, o local onde está colocado, o enchimento excessivo e de forma incorreta são também os principais aspetos a ter em consideração. De forma a evitar erros de medição torna-se essencial a monitorização da temperatura.

Deve-se descongelar, limpar e desinfetar estes equipamentos regularmente para evitar contaminações cruzadas.

Se possível armazenar o material separadamente. Não havendo possibilidade, tomar medidas apropriadas de forma a evitar contaminações cruzadas.

Ações corretivas: Tal como em todos os equipamentos em que o fator principal é a temperatura, em caso de desvios fora do limite crítico, deve-se ajustar a temperatura e voltar a verificar pouco tempo depois. Se necessário recorrer a um técnico qualificado. Todo o material armazenado poderá ter de ser descartado [13].

No Laboratório de Microbiologia da Nestlé de Avanca existe um congelador na Sala de *Salmonella* e outro na Sala de Microbiologia onde podem ser armazenadas algumas amostras.

8.1.6 Autoclaves

Este equipamento é utilizado para esterilização de utensílios, meios de cultura, reagentes usados em meios de cultura assim como também para a esterilização de material contaminado após uso.

Aspetos críticos: A utilização de calor em ambiente húmido é um dos métodos mais eficazes na destruição de microrganismos, resultando na desnaturação das proteínas e destabilização da membrana citoplasmática, que ocorre quando as células são sujeitas a temperaturas superiores à temperatura máxima de crescimento. De forma a assegurar a morte de todas as formas de vida microbiana, normalmente sujeita-se o material a esterilizar a 121°C durante 15 minutos [14]. No entanto, alguns cuidados são necessário ter em atenção, principalmente quando falamos de esterilização de meios. Para que não haja deterioração dos meios recomenda-se o cálculo de F0. Este valor é extremamente útil para ajustar, controlar e qualificar o processo de esterilização por vapor de água saturado. O seu cálculo é importante pois possibilita o ajuste dos programas do autoclave consoante os meios de cultura a esterilizar. Para ser possível o seu cálculo são necessárias sondas de forma a possibilitar a deteção do ponto mais frio do autoclave. Assim, Fo vai ser o tempo necessário para que o ponto mais frio de autoclave atinja 121°C durante o tempo necessário à destruição de um dado microrganismo.

Formula:

$$F_{0121} = \Delta t \sum 10^{(T-T_b)/Z}$$

T = temperatura medida (°C)

Tb = temperatura de referência

Z = 10°C

Não se deve autoclavar meios de cultura frescos com meios contaminados de forma a evitar contaminações cruzadas.

De forma a monitorizar a temperatura no interior do autoclave deve ser usado o termómetro interno e um segundo termómetro inserido num recipiente representativo colocado no ponto mais frio do autoclave.

Ações corretivas: Caso sejam necessária medidas corretivas, deve-se chamar pessoal qualificado para fazer a manutenção/reparação do equipamento [13].

No Laboratório de Microbiologia da Nestlé de Avanca existem três autoclaves na sala de preparação de meios que são utilizados para a esterilização de meios de cultura frescos e contaminados e para a esterilização de material.

8.1.7 Medidores do pH

Estes aparelhos medem a atividade dos iões de hidrogénio numa solução, a uma determinada temperatura. São utilizados para medir o pH de meios de cultura (sólidos e líquidos), reagentes, amostras ou diluições decimais.

Aspetos críticos: O crescimento bacteriano também depende do pH. Cada microrganismo tem um intervalo de pH no qual o seu crescimento é viável. Desta forma, torna-se um aspeto importante controlar o pH dos meios utilizados para cultura dos microrganismos.

De forma a obter-se um valor fiável, antes de qualquer medição efetua-se a calibração do aparelho recorrendo a duas soluções tampão (geralmente pH 4,0 e pH 7,0 a 20°C). Sempre que se muda de solução os elétrodos devem ser enxaguados para eliminar contaminações entre as soluções. Se forem efetuadas muitas medições é aconselhado efetuar-se a calibração mais do que uma vez.

Um aspeto importante é o controlo da temperatura. Este fator interfere no valor de pH.

Ações corretivas: Se forem observados desvios durante a calibração deve-se limpar cuidadosamente os elétrodos e voltar a calibrar o aparelho. Caso não seja o suficiente aconselha-se mudar os elétrodos de pH [13].

No Laboratório de Microbiologia da Nestlé de Avanca existe um medidor de pH na Sala de Preparação de Meios que é normalmente utilizado para medir o pH da água e dos meios preparados diariamente.

8.1.8 Balanças

Estes aparelhos são utilizados para pesar meios de cultura desidratados, reagentes e amostras.

Aspetos críticos: A correta pesagem de meios de cultura desidratados, reagentes ou amostras em quantidades exatas é essencial para produzir resultados corretos. Assim, as balanças utilizadas devem estar devidamente e colocadas em superfícies horizontais estáveis protegidas de vibrações. Consoante o tipo de análise as balanças podem ter diferentes índices de precisão. Esta precisão deve ser verificada mensalmente através de pesos padrão.

É importante manter a balança sempre limpa para evitar a entrada de resíduos nos mecanismos internos do aparelho, como também para evitar contaminações.

Ações corretivas: A monitorização do intervalo da balança deve ser efetuada uma vez por ano. Sempre que necessário deve-se calibrar o aparelho [13].

No Laboratório de Microbiologia da Nestlé de Avanca existem duas balanças na Sala de Microbiologia Geral utilizada principalmente para a pesagem de amostras, uma na Sala de Preparação de Meio onde são pesados os meios, e outra na Sala de Pesagem de *Salmonella*, utilizada para pesagem de amostras para a pesquisa de *Salmonella*.

8.1.9 Instrumentos volumétricos

Estes instrumentos são utilizados para medir volumes específicos de líquidos.

Aspetos críticos: A distribuição de volumes corretos de meios de cultura, diluentes, amostras, reagentes e diluições durante todo o procedimento é importante para garantir resultados precisos. Consoante a precisão necessária pode utilizar-se material volumétrico diferente.

Deve-se proceder à calibração dos instrumentos regularmente, exceto no caso das pipetas graduadas de vidro ou plástico que não necessitam de calibração.

Ações corretivas: no caso de desvio, deve-se calibrar o instrumento. Pode ser necessário recorrer a técnicos qualificados [13].

8.2 Meios de cultura e reagentes

Os meios de cultura e reagentes desempenham um papel essencial na obtenção de resultados corretos. Consistem na associação qualitativa e quantitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento microbiano fora do seu habitat natural. Existe uma ampla diversidade metabólica dos microrganismos, existindo vários tipos de meio de cultura capazes de satisfazerem as suas variadas exigências nutricionais. Além dos nutrientes, outros fatores também são importantes, tais como o pH, humidade, temperatura, entre outras.

Aspectos críticos: Durante todo o procedimento são várias as etapas críticas que asseguram a qualidade dos meios e dos reagentes devendo por isso estar abordadas no plano de controlo interno:

- **Compra** – os fornecedores de meios prontos a usar devem providenciar certificados de qualidade dos meios, eliminando a necessidade do laboratório fazer testes extensivos;
- **Receção** – os meios têm de ser inspecionados visualmente e deve-se registar o número dos lotes e as datas de validade de modo a facilitar a gestão adequada do stock;
- **Armazenamento** – é importante monitorizar os parâmetros de armazenamento, como o tempo, temperatura e humidade;
- **Preparação** – visualização da aparência do meio, pesagem adequada e agitação durante o aquecimento;
- **Esterilização** – é necessário ter em conta as perdas de líquido durante a esterilização e escolher sempre o programa adequado ao tipo de meio e volume em questão;
- **Utilização** – antes de usar verificar a qualidade do meio (cor, formação de precipitado, sinais de crescimento que indiquem contaminações), colocar meios

liquefeitos no banho de $46 \pm 0,1^\circ\text{C}$ antes de usar, nunca reutilizar meio liquefeitos, suplementos sensíveis ao calor só devem ser adicionados aquando do arrefecimento a $46 \pm 0,1^\circ\text{C}$, utilizar os meios sempre em condições de assepsia para evitar contaminações.

- **Verificação da qualidade** – verificação da qualidade do lote, verificação dos meios preparados (pH, utilização de amostras de referência).

Todas estas etapas devem ser controladas através dos devidos registos e de planos de rastreabilidade, que permitam, em caso de desvio, chegar à origem do problema.

Um aspeto importantíssimo que pode interferir com a qualidade dos meios é a água. O seu pH deve ser analisado diariamente uma vez que pode interferir no pH final da solução.

Ações corretivas: No caso de se desconfiar de algum problema ao longo dos procedimentos laboratoriais que possa estar relacionado com a qualidade dos meios ou dos reagentes utilizados, o plano de rastreabilidade possibilita chegar à origem do problema. Consoante o problema detetado, tomam-se as devidas ações corretivas. Pode-se também recorrer ao uso de estirpes de referência positivas e/ou negativas [13].

8.3 Higiene

O controlo da higiene do ambiente de todo o laboratório é um aspeto importante das boas práticas de laboratório. Assim, para um controlo adequado, devem-se seguir os seguintes critérios:

- Trabalhar sempre em condições de assépsia;
- Limpar e desinfetar os locais de trabalho antes e depois de cada análise, especialmente após derrame de material contaminado;
- Limpar e desinfetar regularmente conforme o estipulado os sistemas de ventilação ou ar condicionado, banhos-maria, estufas, frigoríficos, e todos os equipamentos inerentes à rotina analítica.

- Evitar correntes de ar (fechar janelas e portas) e substituir filtros das hottes e câmaras de fluxo laminar com regularidade para garantir a qualidade do ar;
- Monitorizar a qualidade do ar e das superfícies regularmente;
- Eliminar resíduos e produtos testados.

Controlo de qualidade microbiológica do ar

Para verificar a qualidade do ar utiliza-se o método de sedimentação. Coloca-se uma placa com meio de cultura de agar exposta ao ar durante 15 minutos, fecha-se e coloca-se a incubar. Este método recolhe principalmente partículas pesadas.

Controlo da qualidade microbiológica das superfícies

Para verificar o controlo microbiológico das superfícies pode-se recorrer a três métodos:

- Placa de contacto – a superfície do meio de agar é posto em contacto direto com a superfície a ser examinada;
- Zaragatoas – utilizadas para áreas de mais difícil acesso;
- Esponjas – utilizadas para grandes superfícies.

O meio de cultura utilizado varia consoante os microrganismos alvo [13], [15].

Tabela 1 - Exemplo de uma planificação de controlo do ambiente

Local	Método de análise	Frequência	Responsável	Documento de registo
Ar do laboratório	Placa de sedimentação	Semanalmente	Analista	
Ar das estufas	Placa de sedimentação	Semanalmente	Analista	
Água dos banhos	Deteção de <i>E. coli</i>	Semanalmente	Analista	
Filtro da câmara de fluxo laminar	Análise microbiológica do filtro	1x3meses	Analista	
Ar da câmara de fluxo laminar	Sedimentação	Diariamente	Analista	
Hottes	Sedimentação	Diariamente	Analista	

8.4 Analistas

Um pré-requisito para um bom desempenho do analista é um treino apropriado. Este desempenho é avaliado através da repetibilidade, reprodutibilidade intermédia e reprodutibilidade.

Repetibilidade: é definido como a diferença absoluta entre dois resultados de testes individuais independentes obtidos utilizando o mesmo método, em material idêntico, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, num curto intervalo de tempo.

Reprodutibilidade intermédia: é definido como a variabilidade de resultados independentes obtidos por analistas diferentes, utilizando equipamentos diferentes num único laboratório (variações dentro do laboratório).

Reprodutibilidade: é definido como a variabilidade de resultados independentes obtidos em laboratórios diferentes, em dias diferentes, com analistas diferentes, calibrações diferentes e equipamentos diferentes (variação entre laboratórios). Isto é feito através de **testes de performance laboratorial** [16], [17].

Testes de performance laboratorial: testes colaborativos interlaboratórios (testes “P”) em que é feita a análise, sendo os resultados obtidos comparados com o valor de referência. Tem como objetivo:

- Fornecer ferramenta para avaliar o laboratório;
- Identificar problemas no laboratório e iniciar ações corretivas;
- Providenciar uma ferramenta de controlo externo de forma a ajudar na gestão e na melhoria da qualidade dos métodos e dados analíticos;
- Providenciar um certificado de Proficiência necessária ao processo de acreditação [12], [18].

8.5 Verificação de Cumprimento dos Métodos

De forma a verificar se todo o Plano de Controlo de Qualidade Interno do Laboratório de Microbiologia está a ser cumprido, é necessário a existência de um plano de auditorias interno, útil também para a preparação de auditorias externas. Tem como principal objetivo detetar incumprimentos e falhas no desempenho dos diversos procedimentos efetuados no laboratório, estabelecendo, quando necessário, medidas corretivas.

Estas auditorias devem ser executadas regularmente pelo chefe de laboratório ou supervisor do laboratório, devendo incluir:

- Registos de manutenção e limpeza;
- Uso correto dos manuais de laboratório;
- Verificação completa de um ou mais métodos analíticos;
- Registo da calibração dos aparelhos;
- Registo da monitorização das condições de operação [12].

9. Probióticos

O sistema gastrointestinal alberga uma grande variedade de microrganismos, que constituem a flora microbiana intestinal. Esta flora microbiana desempenha um papel importante no desenvolvimento e na manutenção da resposta imune intestinal [19].

A possibilidade de promover e manipular esta flora através da administração de diversos microrganismos de forma a melhorar a saúde do hospedeiro tem sido alvo de variadas investigações. Para alterar a flora intestinal tem-se utilizado **probióticos**, **prebióticos** ou os dois em simultâneo – **simbióticos** [19].

O termo **probiótico** foi inicialmente introduzido na literatura médica por *Lilly & Stillwell*, em 1965, para designar substâncias secretadas por microrganismos capazes de estimular o desenvolvimento de outros microrganismos [19], [20]. Muitas outras definições foram propostas, no entanto, a sugerida pela OMS, e a que atualmente está em vigor, denomina probiótico como sendo “organismos vivos administrados em quantidade adequada, a qual confere um efeito benéfico à saúde do hospedeiro” [21].

Para o crescimento e atividade dos probióticos é necessária a presença de prebióticos. Os **prebióticos** são ingredientes não digeríveis que beneficiam o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e a atividade das bactérias benéficas que tem como potencial melhorar a saúde do hospedeiro [22].

Os prebióticos têm de cumprir os seguintes critérios:

- Não sofrer hidrólise enzimática ou absorção no sistema gastrointestinal;
- Ser um substrato seletivo para um número limitado de bactérias potencialmente benéficas para o hospedeiro;
- Ser capaz de alterar a microflora para uma composição mais saudável.

A designação de alimentos **simbióticos** é conferida aos alimentos que na sua composição incluem microrganismos probióticos e compostos prebióticos [22].

Esta combinação tem como efeitos positivos:

- Aumentar da sobrevivência e viabilidade das bactérias probióticas durante a passagem pelo sistema intestinal superior;
- Aumentar a eficácia da implementação das bactérias probióticas exógenas no sistema intestinal superior;
- Estimular o crescimento e/ou atividades das bactérias probióticas exógenas e endógenas (bifidobactérias) no sistema intestinal;
- Conferir vantagem competitiva sobre espécies nativas nefastas [22].

9.1 Benefícios à saúde

Após a ingestão, os probióticos além de manterem a sua viabilidade após o contacto com a barreira química do estômago, devem aderir à superfície intestinal onde desempenham as suas funções, competindo com agentes patogénicos e modulando as respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro. A alteração da flora microbiana intestinal deve ser favorável, inibindo o crescimento de bactérias patogénicas, promovendo uma digestão adequada e estimulando a função imunológica local de forma a aumentar a resistência à infeção [20].

Assim, os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos ao consumo de probióticos são:

- Alteração do pH intraluminal – produção de compostos orgânicos decorrentes da atividade fermentativa que aumentam a acidez do intestino, inibindo a multiplicação de bactérias potencialmente patogénicas;

- Produção de substâncias com atividade antimicrobiana – produção de proteínas metabolicamente ativas, que auxiliam na eliminação de microrganismos indesejáveis;

- Competição por nutrientes – a disponibilidade de nutrientes representa um fator limitante ao crescimento bacteriano, aumentando a competição e desta forma limitando o crescimento de possíveis microrganismos patogénicos;

- Competição por recetores intestinais de adesão – a capacidade de adesão dos probióticos aos recetores intestinais faz com que as bactérias consideradas patogénicas

tenham mais dificuldade em aderir e desta forma desempenhar o seu efeito enteropatogénico;

- Efeito imunomodulador – capacidade de modificar a resposta a antigénios (por exemplo: foram observados efeitos imunológicos dos probióticos em pacientes com alergia a leite de vaca e dermatite atópica com aumento da secreção de interferon- γ);

- Restauração da alteração da permeabilidade intestinal – alguns probióticos tem a capacidade de estimular a produção de muco na mucosa intestinal, aumentando a eficácia da barreira da mucosa intestinal;

- Quebra de proteínas no sistema gastrointestinal – alguns probióticos são capazes de quebrar proteínas, processo que além de facilitar a digestão pode contribuir para a diminuição de risco de alergia alimentar [20].

9.2 Probióticos em alimentos

Devido ao comprovado aumento do valor nutritivo, os probióticos são em grande parte administrados através de alimentos ditos funcionais, sendo os mais comuns os alimentos infantis, leites fermentados, outros produtos lácteos e algumas preparações farmacêuticas [23]. Para além dos benefícios em termos de nutrição e saúde, as culturas probióticas podem contribuir para melhorar o sabor do produto final ou diminuir a acidez que pode ocorrer normalmente durante o armazenamento e pós-processamento.

Para utilização de culturas probióticas no fabrico de produtos alimentares, tem de se proceder antecipadamente à seleção das bactérias probióticas com base nos seguintes critérios:

- Género bacteriano normalmente associado a humanos;
- Não ser afetado pelas secreções gástrica e biliar;
- Capacidade de aderir e colonizar a mucosa intestinal;
- Capacidade de produzir compostos antimicrobianos;
- Não ser patogénica nem estar associada a algum tipo de doença;

- Não possuir genes de resistência a antibióticos [24].

O número de microrganismos que se devem ingerir para se obter efeito benéfico não é consensual. Para alguns investigadores existe uma dose mínima enquanto que para outros a dose varia com a estirpe, produto e de indivíduo para indivíduo [25].

O processo de fabrico, armazenamento bem como a incorporação dos probióticos nos produtos alimentares são fatores relevantes para que as suas propriedades se mantenham ao longo do tempo, sem perda de viabilidade funcional. Daí o ser importante o uso de probióticos com boas propriedades tecnológicas, com capacidade de resistência e apropriados à produção em larga escala.

Para aumentar a probabilidade de colonização, bem como a possibilidade de uma ação sinérgica na supressão de agentes patogénicos, deve-se proceder à seleção da estirpe probiótica consoante o hospedeiro suscetível de beneficiar com o seu uso, como também podem ser adicionados mais do que uma espécie de probióticos num mesmo produto, uma vez que a sensibilidade entre vários hospedeiros pode variar [25].

As bifidobactérias e os lactobacilos são atualmente as bactérias probióticas mais comercializadas, pertencendo ao grupo de bactérias lácticas.

De entre as bifidobactérias a espécie *Bifidobacterium lactis* é considerada como uma das mais promissoras devido à sua tolerância ao oxigénio e ao ácido, aumentando os níveis de anticorpos e promovendo uma barreira natural no sistema digestivo contra microrganismos patogénicos [20]. Neste momento, é esta espécie que está a ser utilizada na gama de nutrição infantil produzida na Nestlé de Avanca.

9.3 Probióticos e Saúde

Para perceber a importância dos probióticos na saúde é necessário entender as características da flora intestinal normal.

À nascença, o sistema gastrointestinal é estéril, mas rapidamente é colonizado no momento do parto pela flora microbiana vaginal e intestinal da mãe. Os microrganismos a nível ambiental também podem influenciar esta colonização, principalmente nos neo-

natos que nascem por cesariana, sendo que nestes casos, a aquisição de uma flora microbiana intestinal permanente é retardada [20].

Nos recém-nascidos, a flora microbiana intestinal é composta essencialmente por *Streptococcus* e *Enterobactérias*, seguido de *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Bifidobactérias*. Quando alimentados unicamente com leite materno, as *Enterobactérias* diminuem significativamente na segunda semana de vida. Alguns autores, demonstraram que as *Bifidobactérias* são os microrganismos predominantemente encontrados nas fezes de recém-nascidos alimentados por leite materno.

As *Bifidobactérias* são microrganismos anaeróbios, que fermentam a glucose, a galactose e a frutose. Esta fermentação proporciona o aumento da acidez intestinal que inibe o crescimento de bactérias patogénicas, explicando a resistência dos recém-nascidos alimentados por leite materno a infeções gastrointestinais [20], [26].

Estima-se que a flora microbiana intestinal no adulto inclui cerca de 300 a 500 espécies diferentes de bactérias. Qualquer modificação no equilíbrio desta flora resulta num comprometimento das suas funções.

Fatores endógenos ou exógenos podem ser responsáveis por este desequilíbrio, como por exemplo: uso de antibióticos, mudanças alimentares, perturbações do sistema nervoso [27].

Muitos estudos clínicos têm sido conduzidos com o intuito de avaliar os efeitos dos probióticos na prevenção e tratamento de patologias, surgindo evidências de que o consumo de probióticos está relacionado com a melhoria de uma grande variedade de indicadores de saúde e bem-estar, e de que esses benefícios seriam mediados por um ou mais mecanismos [19].

10. Metodologia

O estágio no Laboratório de Controlo de Qualidade da Fábrica da Nestlé de Avanca, decorreu no período de 18 de abril a 28 de outubro.

A primeira fase teve como principal objetivo a integração na equipa do Controlo de Qualidade e o conhecimento dos trabalhos efetuados na rotina diária do Laboratório de Microbiologia.

Terminando a fase de integração, o objetivo foi analisar os registos do Plano de Controlo Interno atualizados recentemente, e através da prática da rotina laboratorial, integrá-los/modificá-los de forma a facilitar o preenchimento dos mesmos. Foram ainda criados novos registos que se detetou estarem em falta. Assim, todos os procedimentos foram verificados, nomeadamente os documentos que servem de suporte para o cumprimento do plano de controlo interno.

10.1 Plano de Controlo Interno

10.1.1 Equipamento

Todos os equipamentos inerentes aos procedimentos efetuados no Laboratório de Microbiologia estão incluídos no Plano de Controlo Interno, de forma a ser possível uma monitorização dos mesmos. É essencial haver um conhecimento quer do funcionamento dos próprios aparelhos como também de todos os cuidados no seu manuseamento. A Tabela 2 faz uma breve descrição do Plano de Controlo Interno dos equipamentos presentes na Sala de Microbiologia Geral, Sala de Pesagem *Salmonella* e Sala de *Salmonella*, e a Tabela 3 os equipamentos presentes na Sala de Preparação de Meios. Por fim, a tabela 4 descreve os documentos criados/atualizados durante o estágio.

Tabela 2- Plano de Controlo Interno - Equipamento - Sala de Microbiologia Geral / Sala de Pesagem *Salmonella* / Sala *Salmonella*

Sala de Microbiologia Geral						
Equipamento	Responsável	Parâmetro	Método	Frequência	Registo	Ação em caso de desvio
Balança (PJ4000)	Analista	Precisão	Verificação com pesos padrão	1xSemana	AVA7311.00	Ajustar e calibrar, tem de ser feito por pessoa qualificada
Balança (PM2000)	Analista	Precisão	Verificação com pesos padrão	1xSemana	AVA7311.00	Ajustar e calibrar, tem de ser feito por pessoa qualificada
Banho-maria (WB14 44°C)	Analista	Estabilidade da temperature	Termómetro Termómetro independente	1xDia 1xMês	AVA7518.00 AVA7313.00	Ajustar Termómetro Ajustar definições
Banho-maria (Julabo 20B 46°C)	Analista	Estabilidade da temperature	Termómetro Termómetro independente	1xDia 1xMês	AVA7518.00 AVA7313.00	Ajustar Termómetro Ajustar definições
Estufas (Heraeus)	Analista	Estabilidade da temperature	Termómetro Termómetro independente	1xDia 1xMês	AVA7518.00 AVA7313.00	Ajustar Termómetro Ajustar Definições
Frigorífico (Liebherr)	Analista	Estabilidade da temperature	Termómetro Termómetro independente	1xDia 1xMês	AVA7518.00 AVA7313.00	Ajustar Termómetro Ajustar Definições
Sala de Pesagem <i>Salmonella</i>						
Balança (Mettler PE6000)	Analista	Precisão	Verificação com pesos padrão	1xSemana	AVA7311.00	Ajustar e calibrar, tem de ser feito por pessoa qualificada
Sala de <i>Salmonella</i>						
Estufas (Memmert ICP400 / ICP800 1;2;3)	Analista	Estabilidade da temperature	Termómetro Termómetro independente	1xDia 1xMês	AVA7518.00 AVA7313.00	Ajustar Termómetro Ajustar Definições
Frigoríficos (Miele/Fricon)	Analista	Estabilidade da temperature	Termómetro Termómetro independente	1xDia 1xMês	AVA7518.00 AVA7313.00	Ajustar Termómetro Ajustar Definições

Tabela 3 - Plano de Controlo Interno – Equipamento – Sala de Preparação de Meios

Equipamento	Responsável	Parâmetro	Método	Frequência	Registo	Ação em caso de desvio
Balança (PG 2002-S)	Analista	Precisão	Verificação com pesos padrão	1xSemana	AVA7311.00	Ajustar e calibrar, tem de ser feito por pessoa qualificada
Banho-maria (Memmert W8 14)	Analista	Estabilidade da temperature	Termómetro Termómetro independente	1xDia 1xMês	AVA7518.00 AVA7313.00	Ajustar Termómetro Ajustar Definições
Banho-maria (Salvis WKV 25E)	Analista	Estabilidade da temperature	Termómetro Termómetro independente	1xDia 1xMês	AVA7518.00 AVA7313.00	Ajustar Termómetro Ajustar Definições
Dispensador (Omnispense)	Analista	Precisão	Medir um mínimo de 5 quantidades em frascos de medição	1xSemana	AVA7311.00	Ajustar e calibrar, tem de ser feito por pessoa qualificada
Estufa (ST5050)	Pessoa que prepara meios	1) Precisão 2) Controlo da temperature	1.1) Bio-indicador 1.2) Papel indicador 2) Termómetro independente	1.1) 1xSemana 1.2) 1xCiclo 2) 1xCiclo	AVA7377.01 AVA7377.01 AVA7313.00	Contactar serviços técnicos
Frigorífico (Bosh)	Analista	Estabilidade da temperature	Termómetro Termómetro independente	1xDia 1xMês	AVA7518.00 AVA7313.00	Ajustar Termómetro Ajustar Definições
Medidor de pH	Analista ou pessoa que prepara meios	Precisão	Calibração com soluções tampão padronizadas pH 4,0 e pH 7,0	1xDia, antes de usar	AVA7249.00	Verificar eléctrodo e eletrólito. Limpar eléctrodo, ajustar e calibrar medidor de pH ou substituir eléctrodo. Substituir as soluções tampão regularmente.
Autoclave (Fedegari)	Pessoa que prepara os meios	Precisão	1) Gravação contínua 2) Bio-indicador 3) Papel indicador	1) Cada ciclo 2) 1xSemana 3) Cada ciclo	AVA7377.01	Contactar serviços técnicos
Autoclave (ELV3870 1&2)	Pessoa que prepara os meios	Precisão	1) Gravação contínua 2) Bio-indicador 3) Papel indicador	1) Cada ciclo 2) 1xSemana 3) Cada ciclo	AVA7377.01	Contactar serviços técnicos
Millipore Elix	1) Analista 2) Dep. Química	Função	1) pH, visualizar cor/depósitos 2.1) Condutividade 2.2) Análise da água para ausência de metais pesados, iões, etc.	1) 1;2xSemana 2.1) Continuamente 2.2) 1xMês		Tratar para remover depósitos de calcário se necessário.
Hotte	Pessoa que prepara os meios	Função de aspiração	Papel contra grelha de pré-filtro	1xMês		Substituir filtro regularmente

Tabela 4 - Documentos do Plano de Controlo Interno criados e atualizados durante o estágio.

Documentos do Plano de Controlo Interno do Laboratório de Microbiologia da Nestlé Avanca	
Atualizados	AVA7521 – Registo Ambiente Análises Microbiológicas
	AVA7543 – Registo Ambiente <i>Salmonella</i> Setor III
	AVA7544 – Registo Ambiente <i>Salmonella</i> Setor IIIA
	AVA7502 – Registo <i>Salmonella</i> Setor Goliath
	AVA7516 – Registo <i>Salmonella</i> Setor IIA
	AVA7517 – Registo <i>Salmonella</i> Setor III – Linha
	AVA7541 – Registo <i>Salmonella</i> Setor III e IIIA – PT
	AVA7542 – Registo <i>Salmonella</i> Setor IV
	AVA7546 – Registo <i>Salmonella</i> Materias Primas
	AVA7193 – Registo Setor Goliath – Linha
	AVA7524 – Registo Águas – Linha
	AVA7524 – Registo Ambiente
	AVA7526 – Registo Natas – Linha
	AVA7527 – Registo Pessoal
	AVA7528 – Registo Água Piscina
	AVA7529 – Registo Setor IIA – Linha
	AVA7530 – Registo Setor III – Linha
	AVA7531 – Registo Setor IIIA – Linha
	AVA7532 – Registo Setor IV – Linha
	AVA7533 – Registo Materias Primas
	AVA7510 – Registo <i>Salmonella</i> Nível Médio – Ambiente
	AVA7520 – Registo <i>Salmonella</i> Nível Médio – Linha
	AVA7547 – Registo <i>Salmonella</i> Nível Médio – PT
	AVA7192 – Registo Setor Goliath – PT
	AVA7534 – Registo Natas – PT
	AVA7536 – Registo Setor II – PT
	AVA7537 – Registo Setor IIA – PT
	AVA7538 – Registo Setor III – PT
	AVA7539 – Registo Setor IIIA – PT
	AVA7540 – Registo Setor IV – PT
	AVA7676 – Registo Preparação de Meios
Criados	AVA7674 – Registo Amostragem Investigação <i>Salmonella</i>
	AVA7677 – Registo Amostragem Investigação Microbiologia
	AVA7671 – Registo Amostragem Setor IIIA Nível Mínimo
	AVA7317 – Registo Controlo de Limpeza

10.1.2 Meios e Reagentes

O plano de controlo de qualidade relativo às preparações de meios e reagentes tinha sido revisto e atualizado recentemente, tendo sido aplicado um plano de rastreabilidade. Este plano tem como objetivo tornar possível o acompanhamento dos meios e reagentes desde a sua receção até ao resultado final. Assim, e com a ajuda dos respetivos registos, é possível analisar um resultado analítico e saber qual o meio de cultura utilizado, quando foi recebido, qual o seu lote, quando foi preparado e qual o seu ciclo de autoclavagem. A Tabela 5 dá um exemplo de códigos de rastreabilidade.

Exemplo prático:

Tabela 5- Exemplo de códigos de rastreabilidade numa folha de registo.

Nº amostra	Data produto	Local	Observ.	Quant. Analítica/g	Resultado			Meios	Código de autoclavagem	Sap
					Neg.	Pos.	N. tip.			
								BPW	<u>F 10102011 C3</u> *	
								RAPP	<u>A2 633 10102011</u> **	
								MLCB	<u>NA 10102011</u> ***	
								BGA	<u>NA 10102011</u> ***	

*

F – Meio autoclavado no Fedegari
10102011 - Data de preparação
C3 - No terceiro ciclo realizado nesse dia

**


A2 – Meio esterilizado no autoclave 2
633 - Ciclo do autoclave
1010201 – Data da preparação

NA – Meio não autoclavado
10102011 - Data de preparação

Na Tabela 6 preenchida aquando da preparação dos meios, código de autoclavagem colocado na tabela anterior que se encontra registado nos próprios meios de cultura preparados, corresponde a um segundo código que nos dá a informação quanto à data de receção e ao lote do reagente. Todas estas informações são importantes, pois estes registos permitem fazer uma rastreabilidade adequada dos meios.

Tabela 6- Exemplo de códigos de rastreabilidade no documento de registo dos meios preparados da Sala de Preparação de Meios.

Reagentes do meio				Meio de cultura	Meio		pH lim.	pH final
Nome	Código reagente	Qtd.	Vol. Água		Nome	Código de autoclavagem		
Água peptonada	010811 VM 299128 F1 *	102 g	4L	900mL	BPW	<u>F 10102011 C3</u>	7±0,2	6,9
RAPP	280311 990304	53,5	2L	10mL	RAPP	<u>A2 633 10102011</u>	5,2±0,2	5,31
Hidróxido de sódio	260911							
MLBC agar	130411 999373 F3	24,5	500mL	500mL	MLCB	<u>NA 10102011</u>	6,8±0,1	6,83
Brilhant G. agar	130411 984284 F3	26g	500mL	500mL	BGA	<u>NA 10102011</u>	6,9±0,2	7,11
Hidróxido de sódio	260911							


010811 → Data da receção
VM 299128 → Lote do frasco
F1 → Número do frasco

Tendo em conta que este plano foi implementado muito pouco tempo antes do meu estágio, o meu trabalho inicial passou pela interpretação das tabelas de registo, e posteriormente, adequa-las de forma a simplificar o trabalho efetuado pelos analistas. Na Tabela 7 encontra-se o Plano de Controlo Interno para meios e reagentes.

Tabela 7 - Plano de Controlo Interno - Meios e reagentes

Item	Parâmetro	Responsável	Método	Frequência	Registo	Comentários/Ações em caso de desvio
Preparação de meios e diluentes	Preparação correta	Pessoa que prepara os meios	pH após esterilização, observação da turbidez, cor, anormalidades, etc.	Cada preparação	AVA7335 - Registo Meios Preparados	pH Incorreto, meio não solidifica, cor anormal, formação de precipitado, etc. Verificar pH e medidor de pH, qualidade da água, ciclo de esterilização (sobreaquecimento), qualidade do meio, etc.
Meios	Esterilidade	Analista	Preparar e incubar várias placas (>2)	Cada Lote	AVA7507. - Registo de esterilidade dos meios e diluentes	Contaminação – verificar autoclave, qualidade do ar, etc.
Diluentes	Esterilidade	Analista	Inocular e incubar	Cada Lote		Resultados anormais. Verificar qualidade do meio, formulação, suplementos, utilizar novos lotes

10.1.3 Higiene e Ambiente

No Plano de Controlo Interno correspondente à higiene e ao ambiente, também revista e atualizada recentemente, o objetivo foi rever os documentos criados, adapta-los à prática laboratorial de forma a facilitar o seu preenchimento e colocá-los nos locais apropriados. Foram ainda criados alguns registos que se verificou estarem em falta. O cumprimento destes registos é bastante importante pois permite fazer uma monitorização do que envolve as análises propriamente ditas, de forma a assegurar um correto controlo de possíveis contaminantes de diferentes partes do laboratório. De seguida são apresentadas as tabelas Tabela 8, Tabela 9, Tabela 10 e Tabela 11 correspondentes aos Planos de Controlo Interno de higiene para a Sala de Preparação de Meios, Sala de Microbiologia Geral, Sala de Pesagem *Salmonella* e Sala de *Salmonella*, respetivamente. Por fim, a Tabela 12, descreve o Plano de Controlo Interno respetivo ao ambiente da Sala de Microbiologia Geral e a Tabela 13 diz respeito ao controlo do ambiente da Sala de Pesagem da *Salmonella*/Sala de *Salmonella*.

Tabela 8- Plano de Controle Interno - Higiene - Sala de Preparação de Meios

			Frequência							
Local/Item	Responsável	Descrição	Por utilização	Diário	Semanal	Quinzenal	Mensal	Trimestral	Semestral	Comentário/Ação
Locais de Laboratório	Chefia	Visual		X						
Superfícies de trabalho	Analista	Visual		X						Desinfetar antes de iniciar trabalho
Bacias	Analista	Visual		X						Desinfecção
Balanças	Analista	Visual	X							Limpar prato e superfície exterior
Banhos-maria	Analista	Visual			X					Mudar água, lavar, limpar com pano e sol. Limpeza
Estufa esterilizadora	Analista	Visual			X					Higienizar e desinfetar
Autoclaves	Analista	Automático			X					Esterilizar 10min, com HCl
Dispensador	Analista	Automática	X							Higienizar tubagens
Placas de Aquecimento	Analista	Visual	X							Higienizar
Micro-ondas	Analista	Visual	X							Higienizar
Medidor de pH	Analista	Visual	X							Limpar e acondicionar electrode
Hotte	Analista	Visual	X							Limpar e higienizar após utilizar
Recipientes de Lixo	Analista	Visual		X						Esvaziar, limpar e desinfetar
Utensílios amostragem	Analista	Visual		X						Higienizar e esterilizar antes de usar
Mat. Limpeza/desinfecção	Chefia	Visual		X						Controlar stocks

Tabela 9 - Plano de Controlo Interno - Higiene - Sala de Microbiologia Geral

			Frequência							
Local/Item	Responsável	Descrição	Por utilização	Diário	Semanal	Quinzenal	Mensal	Trimestral	Semestral	Comentário/Ação
Locais de Laboratório	Chefia	Visual		X						
Superfícies de trabalho	Analista	Visual		X						Desinfetar antes de iniciar trabalho
Bacia	Analista	Visual		X						Desinfecção
Ar Condicionado	Chefia	Visual					X			Mudar filtros se necessário
		Contagem de colónias do ar				X				
Balanças	Analista	Visual	X							Limpar prato e superfície exterior
Banhos-maria	Analista	Visual			X					Mudar água, lavar, limpar com pano e sol. Limpeza
Estufas	Analista	Visual			X					Higienizar e desinfetar
Frigorífico	Analista	Visual					X			Higienizar e desinfetar
Microscópio	Analista	Visual	X							Higienizar
Stomacker	Analista	Visual			X					Exterior - Higienizar e desinfetar
						X				Interna - Higienizar e desinfetar
Recipientes de Lixo	Analista	Visual		X						Esvaziar, limpar e desinfetar
Utensílios amostragem	Analista	Visual		X						Higienizar e esterilizar antes de usar
Mat. Limpeza/desinfecção	Chefia	Visual		X						Controlar stocks

Tabela 10 - Plano de Controlo interno - Higiene - Sala de Pesagem *Salmonella*

			Frequência							
Tipo de equipamento	Responsável	Descrição	Por utilização	Diário	Semanal	Quinzenal	Mensal	Trimestral	Semestral	Comentários/Ação
Locais de Laboratório	Chefia	Visual		X						
Superfícies de trabalho	Analista	Visual		X						Desinfetar antes de iniciar trabalho
Utensílios	Analista	Visual		X						Higienizar e esterilizar antes de usar
Câmara fluxo laminar	Analista	Visual	X							Limpar
	Chefia	Aspiração pré-filtro						X		Controlo analítico "S" das poeiras
		Mudar pré-filtro						X		
		Mudar filtro absolute							X	
Balanças	Analista	Visual	X							Limpar prato e superfície exterior
Meios de Cultura/Reagentes	Chefia	Visual		X						Controlar stocks

Tabela 11 - Plano de Controlo Interno - Higiene - Sala *Salmonella*

			Frequência							
Local/Item	Responsável	Descrição	Por utilização	Diário	Semanal	Quinzenal	Mensal	Trimestral	Semestral	Comentário/Ação
Locais de Laboratório	Chefia	Visual		X						
Superfícies de trabalho	Analista	Visual		X						Desinfetar antes de iniciar trabalho
		Salmonella			X					
Utensílios	Analista	Visual		X						Higienizar e esterilizar antes de usar
Estufas	Analista	Visual			X					Higienizar e desinfetar
Câmara fluxo laminar	Analista	Visual		X						Higienizar e desinfetar
		Salmonella			X					
Câmara UV	Analista	Visual			X					Higienizar
Mat. Limpeza/desinfecção	Chefia	Visual		X						Controlar stocks

Tabela 12 - Plano de Controle Interno - Ambiente - Sala de Microbiologia Geral

Local/Item	Responsável	Descrição	Frequência						Comentário/Ação
			Diário	Semanal	Quinzenal	Mensal	Trimestral	Semestral	
Estufa Heraeus B5042	Analista	Enterobacterias / GAM		X					Placa de Sedimentação
Estufa Heareus B5050	Analista	Fungos e leveduras		X					Placa de Sedimentação
Estufa Heraeus B5090E	Analista	Enterobacterias / GAM		X					Placa de Sedimentação
Ar Condicionado	Analista	Enterobacterias / GAM		X					Placa de Sedimentação
Banho Memmert	Analista	Presença/Ausência de E. coli		X					Semear em placa
Banho Julabo	Analista	Presença/Ausência de E. coli		X					Semear em placa
Superfície local 1	Analista	Enterobacterias / GAM	X						Zaragatoa / Algodão
Superfície local 2	Analista	Enterobacterias / GAM	X						Zaragatoa / Algodão
Superfície local 3	Analista	Enterobacterias / GAM	X						Zaragatoa / Algodão

Tabela 13- Plano de Controlo Interno - Ambiente - Sala de Pesagem *Salmonella* / Sala *Salmonella*

			Frequência						
Local/Item	Responsável	Descrição	Diário	Semanal	Quinzenal	Mensal	Trimestral	Semestral	Comentário/Ação
Sala de Pesagem Salmonella									
Superfície	Analista	Salmonella	X						Zaragatoa / Algodão
Câmara de fluxo laminar	Analista	Salmonella					X		Análise do filtro
Câmara de fluxo laminar	Analista	Salmonella	X						Placa de Sedimentação
Sala Salmonella									
Estufa Memmert ICP 400	Analista	Salmonella		X					Placa de sedimentação
Estufa Memmert ICP 800 (1)	Analista	Salmonella		X					Placa de sedimentação
Estufa Memmert ICP 800 (2)	Analista	Salmonella		X					Placa de sedimentação
Estufa Memmert ICP 800 (3)	Analista	Salmonella		X					Placa de sedimentação
Ar condicionado	Analista	Salmonella		X					Placa de sedimentação
Hotte	Analista	Salmonella	X						Placa de sedimentação
Superficie local 1	Analista	Salmonella	X						Zaragatoas / Algodão
Superficie local 2	Analista	Salmonella	X						Zaragatoas / Algodão
Superficie local 3	Analista	Salmonella	X						Zaragatoas / Algodão

10.1.4 Analistas

O trabalho desempenhado pelos analistas é crucial para a obtenção de resultados fiáveis. O método utilizado para a avaliação do seu desempenho foi a contagem de probióticos. Desta forma, foram avaliados os seguintes parâmetros: Repetibilidade, Reprodutibilidade Intermédia e a Reprodutibilidade.

10.1.5 Verificação de Cumprimento dos Métodos

A verificação do cumprimento dos métodos é efetuada regularmente por auditorias internas onde através do preenchimento de tabelas adequadas avaliam o analista durante o seu trabalho, em diferentes tópicos (medidas de segurança, procedimento e autocontrolo). O cumprimento é sujeito a uma classificação (C-conforme; NC-não conforme; NA – não aplicável), como pode ser visto na Tabela 14. As não conformidades verificadas são então sujeitas a um plano de ação, para que as medidas corretivas sejam implementadas – Tabela 15.

Tabela 14- Exemplos de pontos abordados nas listas de ocorrências

	NA	C	NC	OBSERVAÇÕES
MEDIDAS DE SEGURANÇA				
Boas práticas de laboratório				
Material de laboratório em condições adequadas				
Utilização de luvas				
Pesagem e hidratação dos meios na hotte				
PROCEDIMENTO				
Amostra em pó: Distribuir os pós na superfície do TS (meio de cultura) e permitir hidratação e absorção lentas				
Entre a preparação da suspensão inicial e o tratamento térmico não devem passar mais de 10 minutos				
Homogeneização à mão da suspensão inicial (-1) e retirar X ml para Y ml de TS para efetuar a diluição seguinte (-2)				
Transferir X ml da diluição -1 para 3 tubos de LST duplo e misturar cuidadosamente				
Incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante $24 \pm 2\text{h}$				
Incubar em banho-maria a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ durante $24 \pm 2\text{h}$; se não formar gás estender incubação até $48 \pm 2\text{h}$				
AUTOCONTROLO				
Registo da monitorização da temperatura das estufas e banhos-maria				
Registo do controlo dos termómetros				
Registo de limpeza (incluindo estufas e banhos-maria)				
Registo da qualidade do ar das estufas e laboratório				

Tabela 15 - Local para planos de ação e respetiva avaliação de eficácia existente nas listas de ocorrências

Nº NC	PLANO DE AÇÃO	RESPONSÁVEL	PRAZO	IMPLEMENTADO (S/N)
1				
	Avaliação da eficácia:			
2				
	Avaliação da eficácia:			

10.2 Monitorização dos Probióticos

Um dos trabalhos efetuados pelo laboratório durante este estágio foi o estudo da mudança de parâmetro de liberação para parâmetro de monitorização dos probióticos.

Neste momento, para que um produto seja liberado, tem de ser efetuadas análises de todas as amostras. A alteração para parâmetro de monitorização permite que o produto seja liberado apenas com uma análise a uma amostra por ciclo do aparelho. Ou seja há uma diminuição do trabalho efetuado pelo analista e de todo o material inerente à análise propriamente dita.

Para que seja possível esta alteração, o produto estudado deve cumprir as seguintes especificações estipuladas pelas Nestlé:

- Todas as embalagens apresentarem uma concentração mínima de probióticos de $1,0 \times 10^7$ UFC/g ou 7,0log;
- As análises efetuadas dentro do mesmo lote devem apresentar um coeficiente máximo de variação (CV) de homogeneidade máximo de 18%;
- As análises efetuadas entre lotes devem demonstrar uma capacidade de processo - CpK (capacidade de um dado processo fabricar produtos dentro da faixa de especificação) maior ou igual a 1,3;
- O desempenho analítico, para esta análise específica, deve ser comprovado através dos seguintes limites:
 - Limite de repetibilidade ($r \leq 0,1$);
 - Limite de reprodutibilidade ($R \leq 0,24$).

Participação em testes de proficiência com amostras dos probióticos em questão [16].

10.2.1 Variabilidade dentro do mesmo lote

Para se estudar a variabilidade dentro do mesmo lote, analisaram-se várias amostras do mesmo lote. Os resultados foram posteriormente trabalhados num software de análise estatística, o Qstat, obtendo-se os seguintes valores, representados a fig. 1 e tabela 16.

Data da amostra: 17-03-2011
Probiótico: <i>Bifidobacterium lactis</i>
Produto: Farinha láctea com probióticos
Lote: L1076030

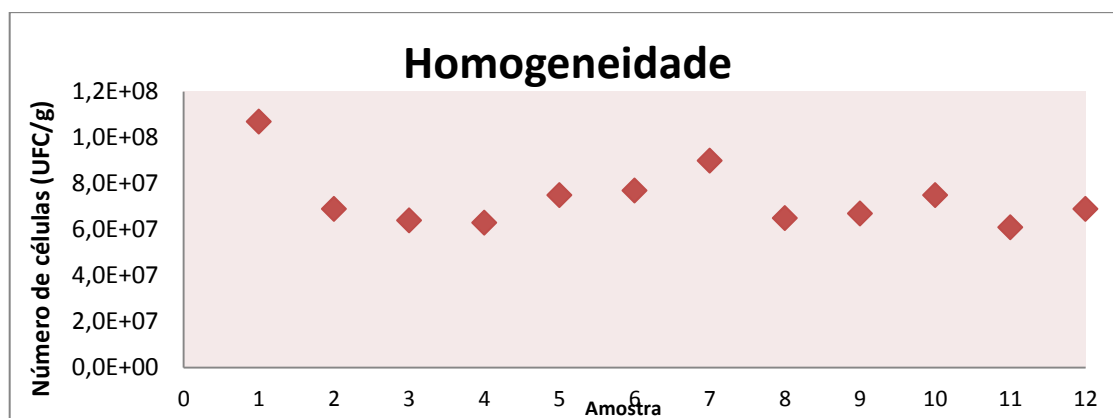


Figura 1 - Concentração de *Bifidobacterium lactis* em diferentes amostras do mesmo lote

Tabela 16 - Valores relativos à homogeneidade dentro de um lote

	Valor	Limites de confiança	
		Inferior	Superior
Média	7,4E+07	5,2E+07	9,5E+07
SD (Total)	1,3E+07	9366318	2,2E+07
CV (Total)	18,00%	12,70%	30,50%
SD (Homogeneidade)	1,3E+07	9366318	2,2E+07
CV (Homogeneidade)	18,00%	12,70%	30,50%

SD = Desvio Padrão; CV = Coeficiente de Variação

Assim:

- Nenhuma das amostras apresenta uma concentração inferior a $1,0 \times 10^7$ UFC/g;
- CV não ultrapassa os 18%.

Logo, os valores encontram-se dentro dos limites especificados pelas normas internas da Nestlé.

10.2.2 Variabilidade entre lotes diferentes

Para se estudar a variabilidade entre lotes diferentes, analisou-se a concentração de *Bifidobacterium lactis* em amostras de lotes diferentes. Depois de trabalhar os resultados no *Qstat* obtiveram-se os seguintes resultados, representados na Fig. 2 e na tabela 17.

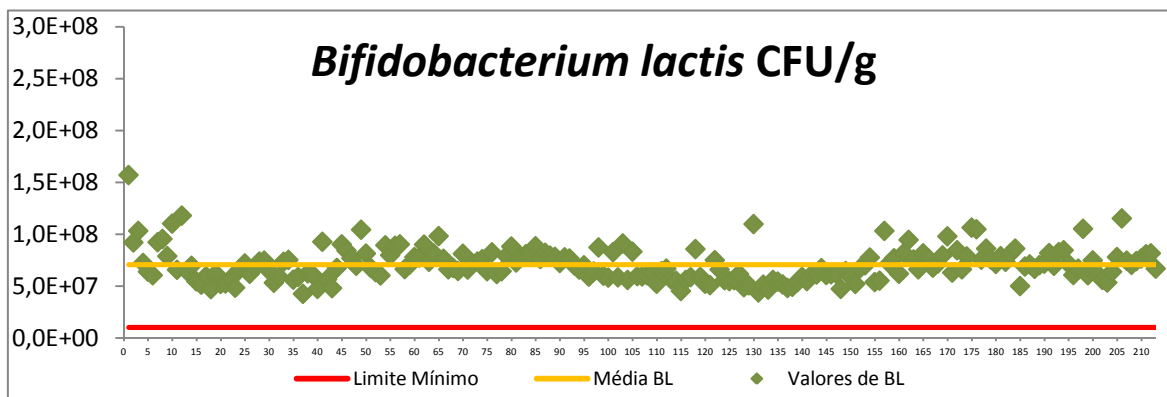


Figura 2- Concentração de *Bifidobacterium lactis* em diferentes amostras de lotes diferentes

Tabela 17 – Valores relativos à homogeneidade entre lotes diferentes

Desvio Padrão:	1,58E+07		Mínimo:	4,25E+07
Média:	7,06E+07		Máximo:	1,57E+08
Limite:	1,00E+07		Nº pontos:	213
Cpk=	1,3			

CpK = Capacidade de Processo

Assim:

- CpK não é inferior a 1,3;

Logo, este valor também vem confirmar que a homogeneidade entre lotes diferentes também se encontra dentro dos limites especificados.

10.2.3 Desempenho analítico

Para avaliar o desempenho analítico, compararam-se:

- Resultados da concentração de probióticos de uma mesma amostra, efetuada em duplicado pelo mesmo analista – Limite de Repetibilidade.
- Resultados da concentração de probióticos de uma mesma amostra, efetuada por analistas diferentes – Reprodutibilidade Intermédia.
- Resultados da concentração de probióticos de uma mesma amostra, efetuada em laboratórios diferentes, em dias diferentes, com analistas diferentes – Reprodutibilidade. Este resultado é obtido através dos testes de *performance* laboratorial.

Estes parâmetros também são utilizados para avaliar o desempenho dos diferentes analistas do laboratório.

Os resultados obtidos foram os seguintes:

Tabela 18 - Resultados dos diferentes analistas na análise da mesma amostra

Data da análise	Analista	Resultado 1 Log (UFC/g)	Resultado 2 Log (UFC/g)	Media	Desvio Padrão
26-04-2011	Analista 1	7,920	7,922	7,956	0,036
26-04-2011	Analista 2	7,696	7,984	7,977	0,007
27-04-2011	Analista 3	7,939	7,913	7,926	0,013
27-04-2011	Analista 4	7,822	7,859	7,840	0,019
28-04-2011	Analista 5	7,819	7,927	7,873	0,054
28-04-2011	Analista 6	7,848	7,851	7,849	0,001

Tabela 19 - Tratamento estatístico dos resultados da tabela 18

	Robusto	Clássico
Média geral	7,883	7,888
Desvio Padrão da média das réplicas	0,054	0,041
Resultado de Repetibilidade		
Desvio padrão de repetibilidade – SDr	0,037	0,038
Desvio padrão relativo de repetibilidade – CVr	0,5%	0,5%
Limite de repetibilidade a 95% (r) para resultados em duplicado	0,102	0,103
Limite de repetibilidade relativo a 95% (r%) para resultados em duplicado	1,3%	1,3%
Resultados de Reprodutibilidade intermédia		
Desvio padrão para a Reprodutibilidade SD(R)	0,060	0,049
Desvio padrão relativo de reprodutibilidade CV(R)	0,8%	0,6%
Limite de reprodutibilidade a 95% (R) para resultados em duplicado	0,165	0,137
Limite de reprodutibilidade a 95% (R%) para resultados em duplicado	2,1%	1,7%

Assim:

- O Limite de Repetibilidade obtido encontra-se no limite máximo;
- O Limite de Reprodutibilidade intermédia encontra-se abaixo do limite estabelecido.

Logo, podemos concluir que os resultados se encontram dentro dos limites especificados pelas normas internas da Nestlé.

Depois do estudo efetuado, e sabendo que os resultados dos testes de proficiência com amostras de probióticos têm tido resultados satisfatórios, há indicações de que a alteração de parâmetro de liberação para parâmetro de monitorização dos probióticos é possível.

11. Conclusão

Durante o tempo de estágio foi possível rever o Plano de Controlo Interno do Laboratório de Microbiologia atualizado recentemente e efetuar algumas alterações de forma a facilitar a sua aplicação na rotina laboratorial.

Revelou-se ser importante a alteração de alguns documentos de registo de forma a simplificar o seu preenchimento, como também a falta de alguns documentos necessários para o cumprimento do controlo interno.

Toda esta atualização/alteração, torna possível uma melhor monitorização de todos os procedimentos realizados no laboratório, conferindo uma maior fiabilidade a todos os resultados analíticos.

Relativamente à monitorização dos probióticos, verificou-se que a alteração de parâmetro de libertação para parâmetro de monitorização é possível.

Este estágio possibilitou o conhecimento das práticas de um laboratório de controlo de qualidade ao nível da indústria alimentar, permitindo o enriquecimento da minha formação numa área pouco explorada durante o meu percurso académico.

12. Bibliografia

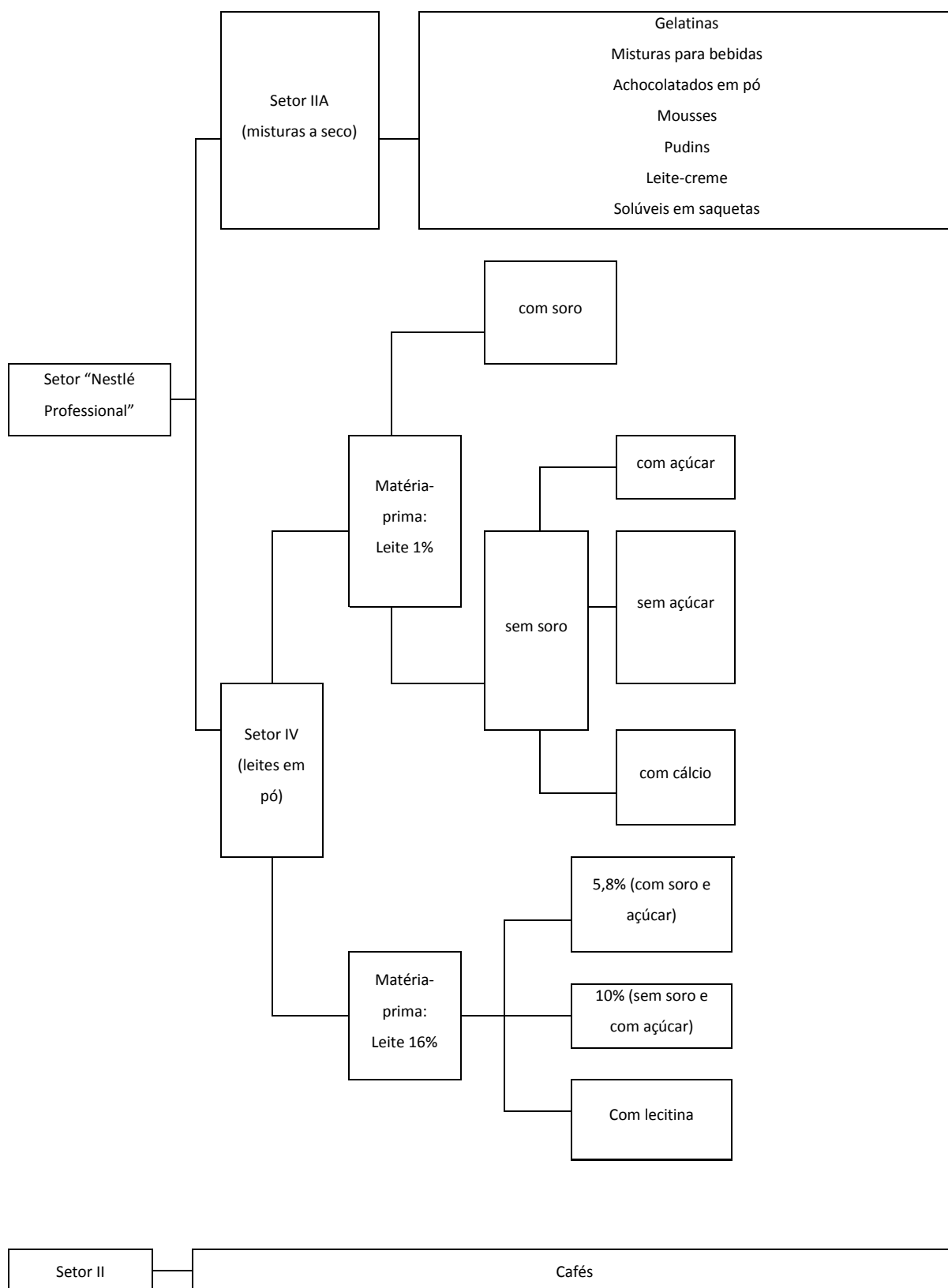
- [1] – Nestlé – Nestlé no Mundo, Disponível em: [\[http://www.nestle.pt/CmsPage.aspx?PageIndex=39\]](http://www.nestle.pt/CmsPage.aspx?PageIndex=39). Consultado em: 01.10.2011.
- [2] - Montville, T., Matthews, K.. (2005). *Food Microbiology – an introduction*. Washington DC: American Society for Microbiology.
- [3] - Raszl, S., Ore, N., Cuellar, J., Almeida, C. (2001). *HACCP: Instrumento Essencial Para a Inocuidade de Alimentos*, Buenos Aires, Argentina: OPAS/INPRAZ,
- [4] - *Importância dos Microrganismos nos Alimentos*, Disponível em: [\[http://paraíso.etfto.gov.br/docente/admin/upload/docs_upload/material_5670b71978.pdf\]](http://paraíso.etfto.gov.br/docente/admin/upload/docs_upload/material_5670b71978.pdf), consultado em: 17.09.2010.
- [5] - Jukes, D., Kandari, D., (2010). Incorporating HACCP into national food control systems – Analysing progress in the United Arab Emirates, *Food Control*, 1-11.
- [6] - Newell, D., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sorng, H., Opsteegh, M. Langelaar, M., Threfall, J., Scheutz, F., Giessen, J., Kruse, H. (2010). *Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge*. *International Journal of Food Microbiology*, 139, S3-S15.
- [7] - *Segurança Alimentar*, Disponível em: [\[http://www.fipa.pt/artigos/art2QSA.pdf\]](http://www.fipa.pt/artigos/art2QSA.pdf). Consultado em: 19.09.2011.
- [8] - Raszl, S., Ore, N., Cuellar, J., Almeida, C.. *HACCP: Instrumento Essencial Para a Inocuidade de Alimentos*, Buenos Aires, Argentina: OPAS/INPRAZ, 2001.
- [9] – Lopes, Homero, (2003). *Garantia e Controle da Qualidade no Laboratório Clínico*. Analisa. Belo Horizonte.
- [10] - Conheça o HACCP, disponível em: [\[http://www.nerba.pt/download/HACCP.pdf\]](http://www.nerba.pt/download/HACCP.pdf), consultado em: 17.01.2011.

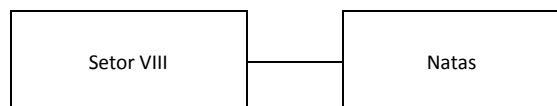
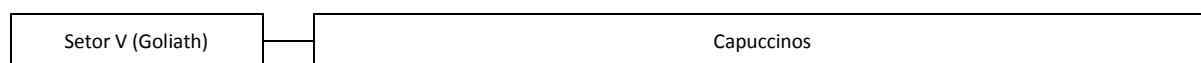
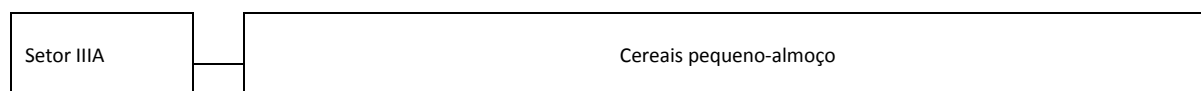
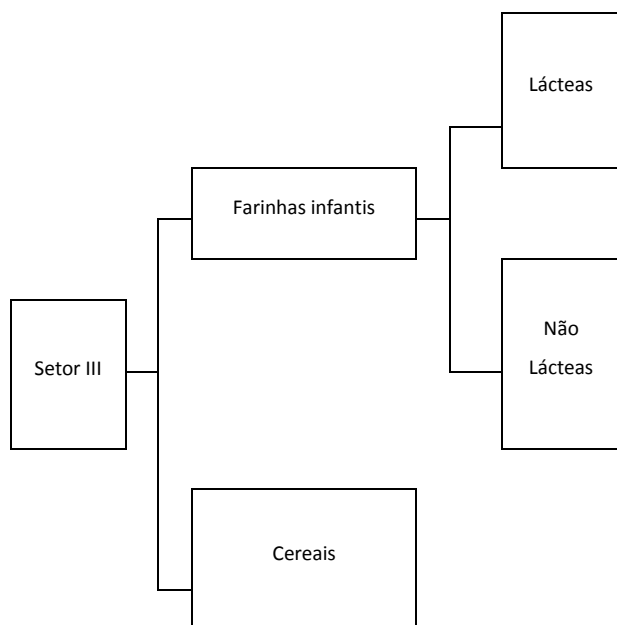
- [11] - Os 7 princípios do HACCP, disponível em: [\[http://www.aldeiadopao.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=242:os-7-principios-do-haccp&catid=62:haccp-a-legislacao&Itemid=74\]](http://www.aldeiadopao.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=242:os-7-principios-do-haccp&catid=62:haccp-a-legislacao&Itemid=74), consultado em: 17.01.2011.
- [12] – Oliveira, M., Sivieri, K., Alegro, J., Saad, S. (2002) *Aspetos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Science, vol. 38, nº.1.
- [13] – Nrc-Qs. (2002). *LI-00702-1 – Internal Control Plan (ICP) For Microbial Laboratories*. In: Nestlé Laboratory Instructions. [Norma Interna Nestlé].
- [14] – Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D. P. (2009). *Brock Biology of Microorganism.*, San Francisco, United States of America: Pearson Education.
- [15] - Nrc-Qs. (1995). *LI-00796-1 – Microorganisms in the air*. In: Nestlé Laboratory Instructions. [Norma Interna Nestlé].
- [16] – Nrc-Qs. (2009). – *LI-00.794 – Enumeration of Probiotic Bacteria*. In: Nestlé Laboratory Instructions. [Norma Interna Nestlé].
- [17] – Michulec, M. (2010). *GI-00.940-3 – Guidelines For The Validation And Verification Of Analytical Methods And Quantitative Chemical Methods*. In: Nestlé Laboratory Instructions. [Norma Interna Nestlé].
- [18] – Grob, I. (2009). *GI-31.503-4 Nestlé Proficiency Tests Guideline*. In: Nestlé Laboratory Instructions. [Norma Interna Nestlé].
- [19] – Sequeira, T., Ribeiro, C., Gomes, M. (2008). *Potencial bioterapêutico dos probióticos nas parasitoses intestinais*. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.9, p.2670-2679.
- [20] – Morais, M., Jacob, C. *The role of probiotic and prebiotic practice*. (2006). Jornal de Pediatria. 82(5Suppl):S189-97.
- [21] – *BabyFood: Baby Food – Probióticos*, Disponível em: [\[http://infantformula-ufrj.blogspot.com/2008/07/baby-food-probiticos.html\]](http://infantformula-ufrj.blogspot.com/2008/07/baby-food-probiticos.html), consultado em: 17.09.2010.
- [22] – Reig, A., Anesto, J. (2002). *Prebióticos y Probióticos, una relación beneficiosa*. Revista Cubana Aliment Nutr 16(1):63-8.

- [23] – Mazo, J., Ilha, E., Arisi, A., Sant’Anna, E. (2009). *Bifidobactérias: Isolamento, Identificação e Aplicação em Alimentos Probióticos*. B.Ceppa, Curitiba v.27, nº1, p.119-134.
- [24] – Rodrigues, D. (2009). *Queijos Simbióticos: caracterização microbiológico e bioquímica*. Universidade de Aveiro. [Tese de Mestrado].
- [25] – Matos, P. (2010). *Probióticos*. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto. [Tese de Mestrado]
- [26] – Vandenplas, Y., Greef, E., et al. (2011). *Probiotics and prebiotics in prevention and treatment of diseases in infant and children*. *Jornal de Pediatria*. 87(4):292-300.
- [27] – Stefe, C. et al. (2008). *Probióticos, Prebióticos e Simbióticos*. *Saúde & Ambiente*. V.3, n.1, p.16-33.
- [28] – Marteau, P. (2001). *Prebiotics and probiotics for gastrointestinal health*. Harcourt Publishers. 20(Supplement 1):41-45.
- [29] – Hungria, T., Longo, P. (2009). *Viabilidade de Lactobacillus casei em alimento probiótico infantil relacionada a vida-de-prateleira*. *Revista Saúde*. 3(3):10-15.
- [30] – Sanders, M., et al. (2011). *Health claims substantiation for probiotic and prebiotic products*. Landes Biocience. *Gut Microbes* 2:3, 127-133.
- [31] – Gorbach, S. (2002). *Probiotics in the Third Millennium*. *Digest Liver Dis*. 34(Suppl.2):S2-7.
- [32] – Lara-Villoslada, F.; Sierra, S.; e tal. (2007). *Efectos beneficiosos en niños sanos del consumo de un producto lácteo que contiene dos cepas probióticas. Lactobacillus coryniformis CECT5711 y Lactobacillus gasseri CECT5714*. *Nutrición Hospitalaria*. 22(4):496-502.
- [33] – Rautava, S. (2007). *Potencial uses of probiotics in the neonate*. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 12, 45-53.
- [34] – Aureli, P.; Capurso, L.; et al. (2011) *Probiotics and health: Na evidence-based review*. *Pharmacological Research*. 63, 366-376.
- [35] – Guarner, F.; Khan, A.; et al. (2008) *Probióticos e Prebióticos*. *Guias práticas da OMGE(Organização Mundial de Gastroenterologia)*.

[36] – Saab. S. (2006). *Probióticos e prebióticos: o estado da arte*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol.1, n.1.

Anexo 1





Texto escrito conforme o Acordo Ortográfico - convertido pelo Lince.